Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Ammoniumbelastung bei Leberkranken mit einem Methodenvergleich zur Ammoniakbestimmung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wilhelm Kunz
aus Stuttgart

1968

9558

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547604_0091

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Ammoniumbelastung bei Leberkranken mit einem Methodenvergleich zur Ammoniakbestimmung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wilhelm Kunz
aus Stuttgart

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. W. Graumann

1. Berichterstatter: Dozent Dr. med. P. Schollmeyer
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. H.E. Bock

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. H.E. Bock, dem Direktor der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, für die Möglichkeit, an seiner Klinik die vorliegende Dissertation zu verfassen.

Besonders danke ich Herrn Doz. Dr. P. Schollmeyer für die Überlassung des Themas, für seinen Rat und seine Hilfe bei der Durchführung und Niederschrift der Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
	Methodische Vorbemerkung	4
II.	KRANKENGUT und METHODIK	5
	1. enzymatische Methode	6
	2. colorimetrische Methode	8
	3. Mikrodiffusionsmethode	9
III.	ERGEBNISSE	12
	1. Belastungsversuche	12
	2. Methodenvergleich	17
IV.	DISKUSSION	22
	1. Belastungsversuche	22
	2. Methodenvergleich	26
V.	ZUSAMMENFASSUNG	32
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	33

I. EINLEITUNG

Im Leberkoma werden zentralnervöse Funktionsausfälle und gleichzeitig erhöhte Blutammoniakspiegel beobachtet (38). Bereits 1893 beschrieben HAHN et al. (14) nach Anlegung einer Eckschen Fistel zwischen der unteren Hohlvene und der Pfortader an Hunden Wesensveränderungen, Ataxie und Somnolenz, die in einen komatösen Zustand übergingen und meistens mit dem Tod der Versuchstiere endeten. Eine Beziehung zwischen der Art der Nahrung und den nervösen Symptomen wurde vermutet, da sich unter Fleischgenuß das Zustandsbild verschlechterte und es sich unter stickstofffreier Ernährung wieder besserte. Die Symptome wurden auf einen Anstieg der Carbaminsäure zurückgeführt, es wurde jedoch auch Ammoniak als auslösendes Agens diskutiert. NENCKI et al. (30) zeigten 1896, daß die Vergiftungserscheinungen mit einem erhöhten Ammoniakgehalt im arteriellen Blut einhergingen. Die Höhe des Ammoniakspiegels war von der Nahrung abhängig. FISCHLER (7) bestätigte diese Hyperammoniämie bei Fleischintoxikation.

Auf die Nervenzellen und wahrscheinlich auch auf die übrigen Körperzellen kann Ammoniak toxisch wirken (13, 23, 27, 34, 49), wenn der normale Blutspiegel während eines längeren Zeitraums überschritten wird. Nach Ansicht von SHERLOCK (42) ist es bis jetzt allerdings noch nicht bewiesen, daß Ammoniakkonzentrationen, wie sie beim Leberkoma vorkommen, für das normale menschliche Gehirn toxisch wirken.

Ammoniak entsteht physiologischerweise an mehreren Stellen im Organismus, einmal als Endprodukt des Proteinstoffwechsels beim Abbau der Aminosäuren und anderer stickstoffhaltiger Substanzen, besonders im Intestinaltrakt durch bakterielle Zersetzung von Nahrungsproteinen und des in den Verdauungstrakt diffundierten Blutharnstoffs (5, 8, 26, 27, 53) und in den Tubuluszellen der Niere mittels Glutaminase aus Glutamin in Abhängigkeit vom pH des Urins (33). Zusätzlich kann es auch im oberen Dünndarm von Leberkranken durch pathologische Besiedlung mit Bakterien zur Ammoniakbildung kommen (25).

In der Regel bestehen bei Patienten mit einer Leberzirrhose innerhalb der Leber Kurzschlußverbindungen zwischen dem protalen und dem cavalen Venensystem. Über diese Kollateralen gelangt Ammoniak an der erkrankten Leber vorbei in den Kreislauf und kann die ihm zugeschriebene toxische Wirkung auf das ZNS entfalten (24). HENNRICH und BREUER (15) glauben, daß eine Ammoniakerhöhung im peripheren Blut in erster Linie vom Ausmaß der beste-

henden Kollateralen (ein frühes Symptom einer portalen Hypertension) und ihrer funktionellen Wirksamkeit abhängt und daß eine Leberschädigung nur eine untergeordnete Rolle spielt. Zur Frage, ob dem Ammoniak bei der Auslösung des Leberkomas eine Bedeutung zukommt, sind von mehreren Arbeitskreisen Versuche mit Hilfe von Ammoniakbelastungen unternommen worden (1, 15, 45, 47, 48, 52). Dabei wurde im allgemeinen der Ammoniumtoleranztest mit einer oralen Zufuhr von 3-5 g NH_4Cl (15, 47, 52) oder 5 g Ammoniumacetat (45) durchgeführt. SUMMERSKILL et al. (48) unternahmen eine intravenöse NH_4Cl-Belastung. Es ist jedoch nicht klar, in welcher Form das zugeführte Ammoniak in den Stoffwechsel eingeschleust wird. An erster Stelle ist die Harnstoffsynthese zu nennen, die eine Funktion der Leber ist. In quantitativer Hinsicht ist die in anderen Geweben nachgewiesene Harnstoffsynthese nur unbedeutend (23). Ammoniak gelangt über die Pfortader und die Arteria hepatica in die Leber. 1932 wurde diese Reaktionskette (Abb. 1) von H. A. KREBS und K. HENSELEIT (23) entdeckt.

Nach der Theorie von BESSMAN (1) wird Ammoniak nach der Passage der Blut-Liquorschranke im Gehirn von Glutaminsäure zu Glutamin gebunden. Die Glutaminsäure regeneriert sich weitgehend über den Zitronensäurezyklus aus α-Ketoglutarsäure. Bei erhöhtem Ammoniakangebot soll im Gehirn α-Ketoglutarsäure zur Bindung des Ammoniak aus dem Zitronensäurezyklus entzogen werden. Die Theorie der Ammoniakbindung im Gehirn scheint durch eine konstante Erhöhung von Glutamin im Liquor komatöser Leberkranker bestätigt (11). SUMMERSKILL et al. (48) beobachteten dagegen eine Vermehrung von α-Ketoglutarsäure im Liquor. G. STOHMAYER et al. fanden zwar eine α-Ketoglutarsäurevermehrung im Blut (46), da aber α-Ketoglutarsäure die Hirn-Liquorschranke nicht passieren kann, steht dieser Mehranfall dem Gehirn nicht zur Verfügung. Bei oraler Belastung mit 4 g NH_4Cl bei Leberkranken konnten sie trotz starker Ammoniakvermehrung im Venenblut keine signifikante Änderung von α-Ketoglutarsäure und Pyruvat nachweisen. Die Ketosäuren steigen lediglich gegen Ende des Tests (nach 150 Minuten) leicht an. In denselben Versuchen kam es bei 4 Zirrhosekranken mit einem ausgeprägten porto-cavalen Kollateralkreislauf zu einem Anstieg der α-Ketoglutarsäure, der dem Anstieg der Ammoniakkonzentration parallel ging und nach 15 - 30 Minuten die höchste Konzentration erreichte. Diese Befunde sprechen gegen die Vorstellung, daß es bei einer Hyperammoniämie zu einer vermehrten Bindung von Ammoniak an α-Ketoglutarsäure zu Glutaminsäure kommt. In diesem Falle müßte bei stark erhöhten Ammoniakwerten eine Verminderung der α-Ketoglutarsäure im Blut gefordert werden.

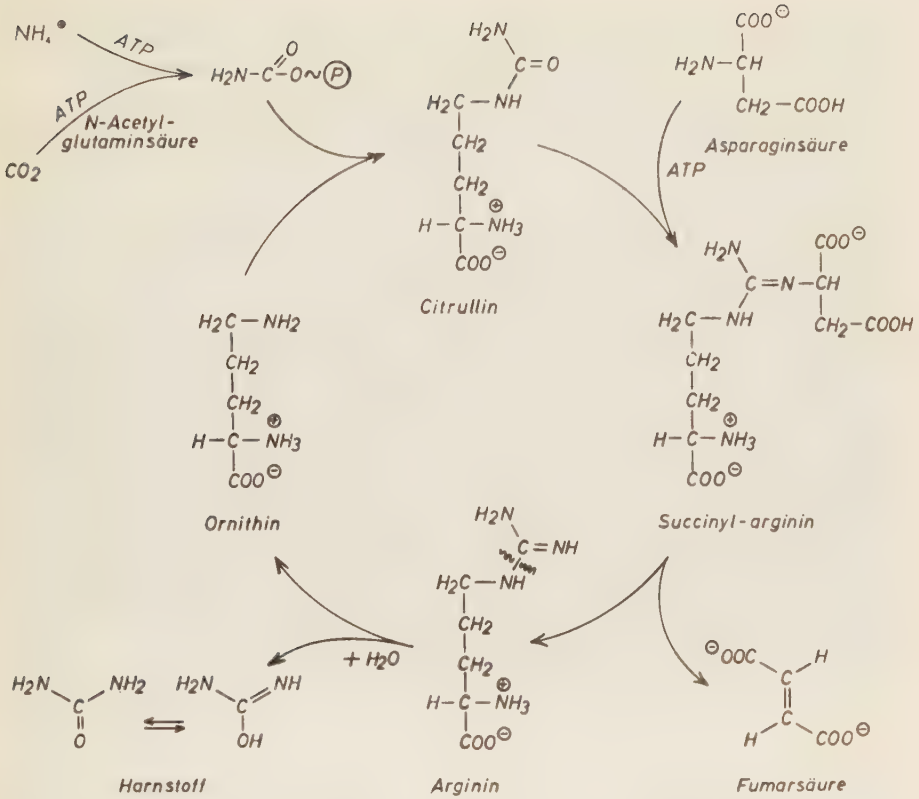

Abb. 1: Harnstoffzyklus nach KARLSON

Fragestellung:

Ob zwischen der Ammoniakerhöhung bei chronischer Leberinsuffizienz und der Erhöhung der Ketosäuren eine ursächliche Beziehung besteht, ist bisher nicht entschieden. In den folgenden Untersuchungen interessierte die Frage, ob sich gesetzmäßige Beziehungen zwischen Ammoniak- und Ketosäuregehalt im Blut aufzeigen lassen. Es sollte untersucht werden, ob durch Ammoniakerhöhung nach intravenöser Belastung mit Ammoniumchlorid ein Anstieg der Ketosäuren im Blut ausgelöst oder ob durch Bindung des Ammoniaks an α-Ketoglutarsäure und Pyruvat eine Verminderung der Ketosäuren hervorgerufen wird. Für die Belastungsversuche wurde eine intravenöse Zufuhr von Ammoniumchlorid gewählt, um - von der Resorption unabhängig - innerhalb eines bestimmten Zeitraumes das Ammoniumchlorid applizieren zu können.

Methodische Vorbemerkungen:
Im Verlauf unserer ersten Untersuchungen, in denen die enzymatische Methode zur Ammoniakbestimmung zur Anwendung kam, wurden neue Methoden zur Ammoniakbestimmung veröffentlicht. Diese legten es nahe, verschiedene Bestimmungsmethoden im Hinblick auf Genauigkeit, Reproduzierbarkeit, Übereinstimmung, Arbeitsaufwand und Brauchbarkeit für den Routinebetrieb zu untersuchen.

Die Mehrzahl der Autoren bestimmte den Ammoniakgehalt im Blut und anderem biologischen Material nach folgendem Prinzip:
Bei saurem pH liegt Ammoniak als Ion (NH_4), bei alkalischem pH als gasförmiges NH_3 vor. Aus einem Untersuchungsmaterial kann Ammoniak durch Alkalisieren ausgetrieben und in einer Vorlage aufgefangen werden. Die Bestimmung des Ammoniaks erfolgt anschließend durch Rücktitration mit Säure oder durch colorimetrische Analyse. In einer direkten Bestimmungsmethode kann Ammoniak im Untersuchungsmaterial nach Ausfällung des Eiweißanteils direkt mittels einer geeigneten Farbreaktion (22) nachgewiesen und colorimetrisch bestimmt werden. Die Farbreaktion kann durch ein enzymatisches Verfahren ersetzt werden. Eine Austreibung des Ammoniaks wird dabei umgangen. In dieser Arbeit werden eine enzymatische Methode, eine Mikrodiffusionsmethode und eine colorimetrische Methode zur Bestimmung des Blutammoniaks miteinander verglichen.

II. KRANKENGUT UND METHODIK

Die Belastungsversuche mit intravenöser Zufuhr von Ammoniumchlorid (NH_4Cl) wurden an 7 gesunden Versuchspersonen und 22 Leberkranken durchgeführt. 12 der Patienten hatten eine Leberzirrhose, 5 eine chronische Hepatitis, 4 eine akute Hepatitis, einer eine Cholangitis und einer einen tumorösen Verschlußikterus. Die Diagnose wurde gesichert durch den klinischen Befund, Leberfunktionsproben, Leberblindpunktion und Laparaskopie. Nach einer Blutentnahme zur Bestimmung der Ausgangswerte von Ammoniak, Pyruvat und Ketoglutarat erhielten die Patienten und die lebergesunden Versuchspersonen in nüchternem Zustand während 40 bis 50 Minuten 40 mg NH_4Cl/kg Körpergewicht in 250 ml physiologischer Kochsalzlösung infundiert. Die Infusionen wurden im allgemeinen gut vertragen. In wenigen Fällen klagten die Patienten über Übelkeit, Kopfschmerzen und Schwindelgefühl. Nur zwei Patienten mit einer schweren Leberzirrhose mußten erbrechen. 5, 20, 40 Minuten nach Infusionsende wurde wiederum Venenblut zur Substrat- und Ammoniakbestimmung entnommen. Die Patienten hielten während der gesamten Versuchsdauer Bettruhe ein. Bei diesen Untersuchungen wurde die Ammoniakbestimmung mit der enzymatischen Methode durchgeführt.

Methodenvergleich:
Bei 21 lebergesunden Versuchspersonen wurde der Ammoniakgehalt des aus der Vene entnommenen Blutes mit 3 verschiedenen Methoden gleichzeitig bestimmt, nämlich:

1) Enzymatische Methode (21)
2) Colorimetrische Methode (28)
3) Mikrodiffusion und Reaktion mit Nesslers Reagens (37).

Nach Punktion der Vene wurde das Blut sofort aus einer Spritze den verschiedenen Ansätzen zugefügt und sofort aufgearbeitet.

1. Enzymatische Mikrobestimmung des Ammoniaks nach KIRSTEN und KIRSTEN (21)

Prinzip:
Ammoniak kann mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion, die im neutralen Milieu abläuft bestimmt werden. Bei dieser Reaktion stellt NH_4 ein Substrat dar:

$$\text{Glutamat} + NAD^+ + H_2O \quad \underset{-}{/\ \text{Glu-DH}\ /} \quad \alpha\text{-Ketoglutarat} + NH_4^+ + NADH + H^+$$

Die Reaktion verläuft im Ansatz von rechts nach links. Gemessen wird die Oxydation des $NADH+H^+$ zu NAD bei 366 mμ.

Durchführung:
Das aus der Vene entnommene Blut wird sofort am Krankenbett mit eisgekühlter 20 % TCE (Trichloressigsäure) im Verhältnis 1 : 1 enteiweißt. Das TCE-Präcipitat wird in der Kühlzentrifuge scharf abzentrifugiert. Der klare Überstand wird nach Zugabe von einem Tropfen Methylrot mit 2n NaOH bis zum Farbumschlag neutralisiert. Der neutralisierte Extrakt muß sofort dem Testansatz zugefügt werden.

Testansatz:

1,45 ml TRAP - EDTA Puffer (250 mM)
0,1 ml Ketoglutarat (130 mM)
0,03 ml $NADH+H^+$ (Natriumsalz, enzymatisch reduziert 10 mg auf 1 ml Natriumbikarbonat 1 %)
0,4 ml neutraler Extrakt.

Nach Einstellung des Gleichgewichts wird die Reaktion mit 0,04 ml Glutamat-Dehydrogenase (Lösung in Glycerin) gestartet. Die Reaktion ist nach 10 - 20 Minuten abgelaufen. Die Extinktionsmessung erfolgt im Photometer "EPPENDORF" mit angeschlossenem Schreiber bei 366 mμ und einer Küvettenschichtdicke d = 1.

Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Gleichzeitig muß ein Reagentienleerwert mitbestimmt werden, der anstelle des neutralen Extrakts 0,4 ml dest. H_2O enthält. Ein großer Teil des Leerwertammoniaks ist dem Enzym und der Ketoglutaratlösung zuzuschreiben (21). Bei 20 Normalpersonen wurde der prozentuale Anteil der Leerwertextinktion an der Gesamtextinktion einer Blutprobe bestimmt. Dieser Wert ist von der Höhe der Ammoniakkonzentration abhängig. Der Mittelwert beträgt 71 %, die Standardabweichung $s = \pm 11$ %.

Kurvenverlauf der enzymatischen Reaktion

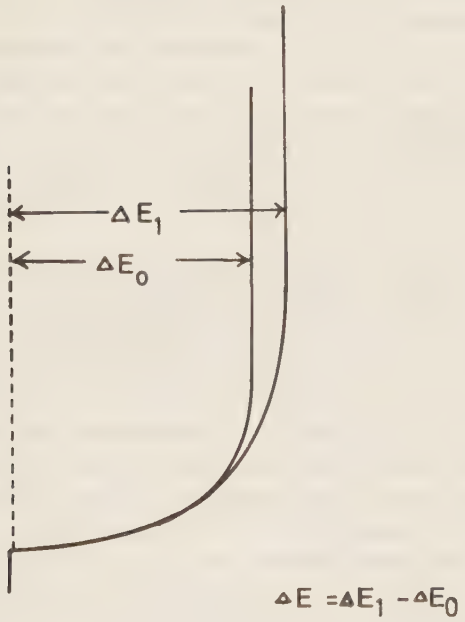

Abb. 2: Kurvenverlauf der enzymatischen Reaktion

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Blutgewicht + Säure} \times \text{saurer Überstand + 2n NaOH} \times \text{Küvetteninhalt} \times \Delta E}{\text{Blutgewicht} \times \text{saurer Überstand} \times \text{neutraler Extrakt} \times 3{,}33} = \mu\text{Mol}/_{l}$$

2. Ammoniakbestimmung mittels der Phenol-Hypochlorit-Reaktion, modifiziert nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER (28)

Prinzip:
Freies Ammoniak wird aus dem Vollblut nach Enteiweißung direkt mittels einer geeigneten Farbreaktion photometrisch nachgewiesen. Eine Isolierung des Ammoniak wird somit umgangen. Man nimmt an, daß zunächst Phenol in Gegenwart von NH_3 zu einem Chinonimin oxydiert wird, das dann durch Kondensation den Farbstoff bildet, dessen Natur jedoch noch unbekannt ist (9). Es besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen der Ammoniakkonzentration und der Intensität des blauen Farbstoffs, die im Photometer bestimmt werden kann.

Durchführung:
2 ml Venenblut aus einer 5 ml Spritze werden durch 2 ml 10 % Trichloressigsäure (TCE), die in eisgekühlten Zentrifugengläser ans Krankenbett gebracht werden, enteiweißt. Für jede Bestimmung wird ein Doppelansatz vorbereitet. Die zugegebene Blutmenge wird mittels Differenzwägung genau festgestellt. Das TCE-Präcipitat wird sofort in der Kühlzentrifuge scharf abzentrifugiert. Vom klaren Überstand werden je zweimal 0,5 ml in 4 Reagensgläser abpipettiert. In jedes Reagensglas werden 2 ml Phenolreagens und 2 ml Hypochloritreagens pipettiert und jeweils durch Schütteln gemischt. Diese Ansätze kommen zur Farbentwicklung 30 Minuten in ein Wasserbad mit 37° C. Die Extinktionsmessung erfolgt im Photometer "EPPENDORF" gegen Wasser bei 578 m μ und einer Küvettenschichtdicke d = 1. Die Extinktion wird mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der Division der geforderten Blutmenge (2 ml) durch die tatsächlich einpipettierte Blutmenge ergibt.

Gleichzeitig werden Doppelbestimmungen für den Reagentienleerwert und einen Standard durchgeführt. Diese enthalten an Stelle von Blut 2 ml H_2O bzw. 2 ml einer 200 γ% NH_4Cl-Lösung, denen 2 ml 10 %ige TCE zugesetzt werden und die wie die Blutproben aufgearbeitet werden. Die Ammoniakmesswerte ergeben sich aus folgender Formel:

$$\frac{\gamma\% \text{ Standard} \times (\text{E Blutprobe} \times \text{Faktor} - \text{E Leerwert})}{\Delta \text{E Standard} - \Delta \text{E Leerwert}} = \gamma\% \ NH_3$$

3. Ammoniakbestimmung durch Mikrodiffusion und Reaktion mit Nesslers Reagens nach SELIGSON, modifiziert nach RICHTERICH und COLOMBO (37)

Prinzip:
Ammoniak muß aus dem Untersuchungsmaterial isoliert werden. Bei einer direkten "Nesslerisierung" entstehen häufig Trübungen. Zur Isolierung hat sich die Methode der Mikrodiffusion bewährt, die es auch ermöglicht, eine Ammoniakbestimmung im Vollblut durchzuführen.

Ammoniak liegt bei saurem pH als Ion (NH_4^+) vor, bei alkalischem pH jedoch als gasförmiges NH_3. Bei der Mikrodiffusion wird in einem geschlossenen System NH_3 durch Alkalisieren mit gesättigtem Kaliummetaborat aus dem Untersuchungsmaterial freigesetzt. Das Gas, das freigesetzt wird, schlägt sich auf einer säurehaltigen Oberfläche als Ammoniumsulfat nieder. Da die übrigen Stoffe im Untersuchungsmaterial nicht flüchtig sind (36), erhält man eine reine Ammoniaklösung, die bei der Reaktion mit Nesslers Reagens zu keiner Trübung führt. Eine photometrische Bestimmung der NH_3-Konzentration läßt sich so ohne Schwierigkeiten durchführen.

Die Mikrodiffusionsmethode erfaßt den Gesamtammoniak (NH_3-N). Unter Blutammoniak bzw. Blut-NH_3 wird die Summe des dissoziierten und nicht dissoziierten Ammoniak verstanden. Die Bezeichnung NH_3-N bedeutet Ammoniakstickstoff.

Durchführung:
Das aus der Vene entnommene Blut wird sofort am Krankenbett in die vorbereiteten Seligsonfläschchen pipettiert, die je 1 ml Kaliummetaborat enthalten. Der die Gläschen dicht verschließende Stopfen trägt einen aufgerauhten Glasstab, der mit 10 n H_2SO_4 benetzt und mit einem Filterpapier vorsichtig abgetrocknet wurde, um eine Tropfenbildung zu vermeiden. Der Stab darf beim Aufsetzen weder die Glaswand noch die Flüssigkeit berühren. Um ein Gerinnen des Blutes zu vermeiden, muß das Pipettieren rasch erfolgen. Die Schlifffläche darf dabei nicht berührt werden, da diese absolut trocken bleiben muß. Die sofort verschlossenen Gläschen werden 30 Minuten in einem Rotationsrad gedreht, um den Diffusionsvorgang zu beschleunigen. Ammoniak diffundiert nun aus dem Blut in der Flasche auf den Glasstab. Nach Abschluß der Mikrodiffusion werden die Rauhstabstopfen abgenommen, ohne dabei den Rand des Gläschens zu berühren. Sie werden direkt auf Glasröhrchen mit dem gleichen Schliff aufgesetzt, die jeweils 3 ml NESSLERS Reagens nach VANSELOW (in Verdünnung 1 : 20 mit aqua bidest.)(50) enthalten. Das aufdiffundierte Ammoniak wird durch Schütteln (1 Minute) abgewaschen und nach einer Reaktionszeit von 15

Minuten bei einer Küvettenschichtdicke d = 1 und der Wellenlänge 436 mμ im Photometer "EPPENDORF" photometriert. Die Werte werden gegen H_2O abgelesen.

Der gleichzeitig mitbestimmte Leerwert und ein Standard enthalten an Stelle von Blut 1 ml aq. bidest. bzw. 1 ml einer 200 γ% NH_4Cl-Lösung. Die Ammoniakmeßwerte ergeben sich aus dem Vergleich mit dem Standard und dem Leerwert. Es wurden 3fach Bestimmungen durchgeführt.

Enzymatische Bestimmung von Pyruvat und Ketoglutarat (BÜCHER).

Prinzip der Pyruvatbestimmung (3):
LDH (Lactat-Dehydrogenase) katalysiert die Hydrierung von Pyruvat mit reduziertem NADH.

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH+H}^+ \xrightarrow[-]{/\,\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}$$

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der rechten Seite. Bei Überschuß an $NADH+H^+$ läuft die Reaktion schnell ab und überführt Pyruvat quantitativ in Lactat. Gemessen wird die Abnahme der $NADH+H^+$-Extinktion.

Prinzip der α-Ketoglutaratbestimmung (2):
Glu-DH (Glutamat-Dehydrogenase) katalysiert die Reaktion:

$$\alpha\text{-Ketoglutarsäure} + \text{NADH+H}^+ + \text{NH}_4 \xrightarrow[-]{/\,\text{Glu-DH}} \begin{matrix}\text{Glutamat} + \text{NAD} \\ + \text{H}_2\text{O}\end{matrix}$$

Bei einem Überschuß an NH_4-Ionen und $NADH+H^+$ wird α-Ketoglutarat quantitativ in Glutamat überführt. Gemessen wird die Abnahme der $NADH+H^+$-Extinktion.

Durchführung:
Pyruvat und α-Ketoglutarat können in einem Ansatz nacheinander bestimmt werden.

5 ml Venenblut werden unmittelbar nach der Entnahme am Krankenbett mit 10 ml eiskalter 3,5 %iger Perchlorsäure ($HClO_4$) enteiweißt. Die zugegebene Blutmenge wird mittels Differenzwägung genau bestimmt. Die Dichte des Blutes kann für die Umrechnung mit 1,06 g/ml angesetzt werden. Das ermittelte Blutgewicht wird also mit 1,06 dividiert. Das Präzipitat wird in der Kühlzentrifuge scharf abzentrifugiert. Der saure Überstand wird im Verhältnis 1 : 2 mit einem Phosphatpuffer (1,1 M K_2HPO_2) neutralisiert. Der Ansatz soll 10 Minuten im Eisbad stehen, damit Kaliumperchlorat vollständig ausfällt.

Zur Bestimmung des Pyruvats und des α-Ketoglutarats wird folgender Testansatz vorbereitet, wobei Testpackungen der Fa. Boehringer Mannheim verwendet wurden (4):

0,4 ml Ammoniumsulfat (0,4 M)
0,05 ml $NADH+H^+$ (Natriumsalz, enzymatisch reduziert. 10 mg auf 1 ml Natriumbikarbonat 1 %).
3,0 ml neutraler Extrakt

Nach Einstellung eines Gleichgewichts wird die Reaktion mit 0,01 ml LDH (Lactat-Dehydrogenase für analytische Zwecke, Kristallsuspension, Kaninchenmuskel) gestartet. Nach Ablauf der Reaktion werden 0,04 ml Glu-DH (Glutamat-Dehydrogenase für analytische Zwecke, Lösung in Glycerin) zugesetzt und damit die Reaktion zur Ketoglutaratbestimmung gestartet. Nach Ablauf dieser Reaktion wird mit 0,02 ml Glu-DH noch einmal ein Nachstart durchgeführt, um die Eigenextinktion des Enzyms zu erfassen. Die Messung erfolgt im Photometer "EPPENDORF" mit angeschlossenem Schreiber bei 366 mμ und einer Küvettenschichtdicke d = 2.

Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Blutgewicht + Säure} \times \text{saurer Überstand + Puffer} \times \text{neutraler Überstand + Küvettenzusatz} \times E}{\text{Blutgewicht} \times \text{saurer Überstand} \times \text{neutraler Überstand} \times 3,33} = \mu M$$

III. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse der Belastungsversuche

Nach intravenöser Belastung mit 40 mg NH_4Cl/kg Körpergewicht, durchgeführt an 7 gesunden Versuchspersonen und 22 Leberkranken, kommt es in allen Fällen zu einem Anstieg der Ammoniakkonzentration im Venenblut. Die Einzelwerte schwanken stark. Wie aus dem Vergleich der Abb. 3 zu erkennen ist, liegen die Ausgangswerte bei den Leberkranken (146 ± 90 γ%), besonders bei den Patienten mit einer Leberzirrhose, höher als bei den gesunden Versuchspersonen (90,7 ± 42,8 γ%). Die Erhöhung der Ammoniakkonzentration bei diesen Leberkranken läßt sich statistisch nicht sichern. 5 Minuten nach Infusionsende erreicht die Patientengruppe höhere Mittelwerte als die Kontrollpersonen (Normalpersonen: 203,4 ± 109,4 γ%; Leberkranke: 322 ± 210,1 γ%). Die Standardabweichung nimmt zu und ist besonders bei den leberkranken Versuchspersonen deutlich ausgeprägt. Bei den Patienten mit einer Leberzirrhose ist der Anstieg der Ammoniakkonzentration am höchsten. 20 Minuten nach Infusionsende sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen in beiden Gruppen abgefallen (Normalfälle: 127,3 ± 46,2 γ%; Leberkranke: 229 ± 160,7 γ%). Bei 2 Patienten mit einer Hepatitis und einem Patienten mit einer Leberzirrhose sind die Ammoniakwerte noch weiter angestiegen. 40 Minuten nach Infusionsende erreichen die Lebergesunden annähernd den Ausgangswert (103,8 ± 33,0 γ%), während bei den Leberkranken der Mittelwert noch ungefähr 25 % über dem Ausgangswert liegt. Die Standardabweichung bei den Lebergesunden liegt unter der des Ausgangswertes.

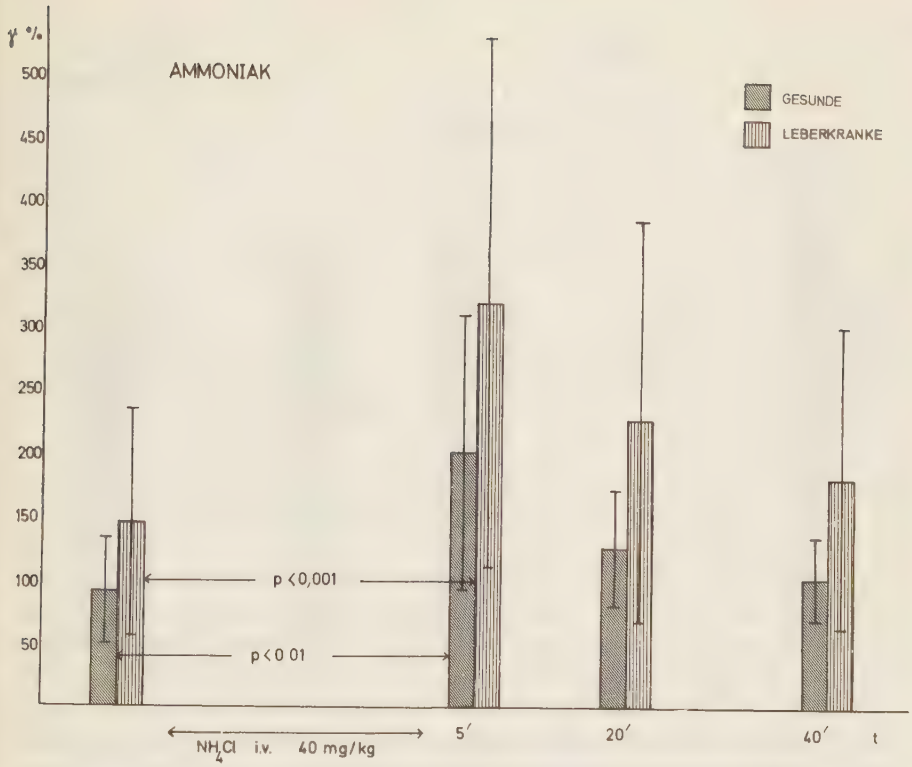

Abb. 3: Verhalten des Ammoniaks während des Belastungszeitraums

Die Abb. 4 und 5 zeigen das Verhalten von Pyruvat und Ketoglutarat während des Belastungszeitraums.

Bei den leberkranken Versuchspersonen liegen sowohl für Pyruvat ($\bar{x}$ = 97 µM/l) als auch für α-Ketoglutarat ($\bar{x}$ = 18,63 µM/l) die Ausgangswerte deutlich höher als die entsprechenden Werte bei den lebergesunden Kontrollpersonen (Pyruvat: $\bar{x}$ = 78,85 µM/l; α-Ketoglutarat: $\bar{x}$ = 10,6 µM/l). Dieser Anstieg der Ketosäuren bei Patienten mit einem chronischen Leberschaden läßt sich für α-Ketoglutarat im t-Test nach STUDENT statistisch sichern ($p < 0,005$). Der Pyruvatanstieg ist statistisch nicht signifikant. Die Standardabweichung ist bei den Patienten größer als bei den gesunden Versuchspersonen. Für Pyruvat und α-Ketoglutarat läßt sich 5 Minuten nach Infusionsende ein deutlicher Abfall des Mittelwertes gegenüber dem Ausgangswert erkennen. Der Abfall der Pyruvatkonzentration beträgt ca. 18 % auf $\bar{x}$ = 79,00 µM/l (s = ± 26,64 µM/l),

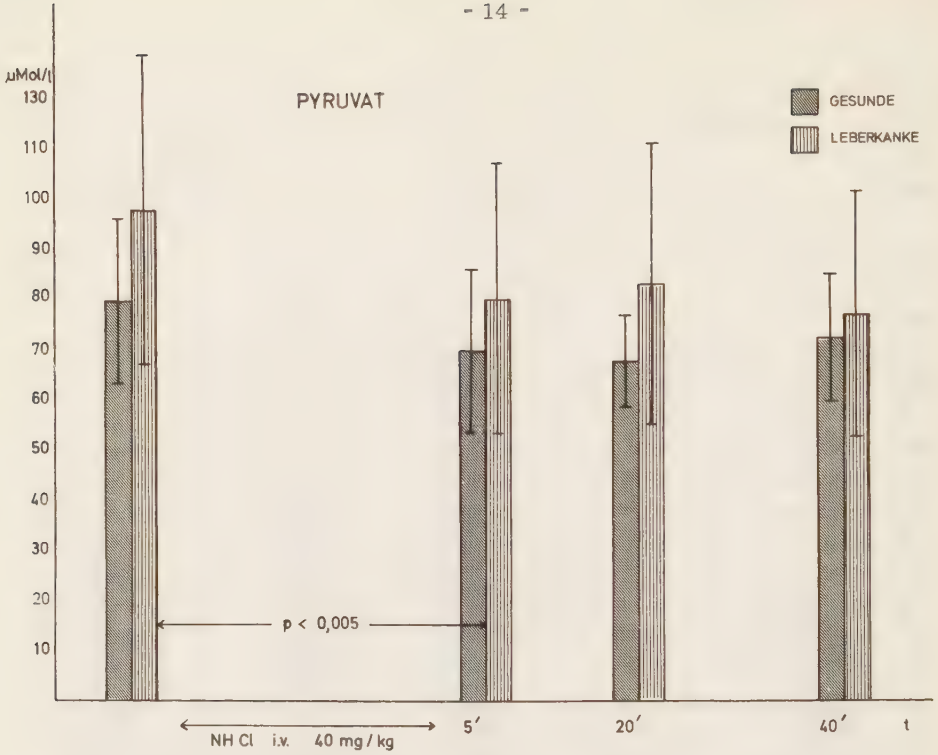

Abb. 4: Verhalten des Pyruvats bei Leberkranken und gesunden Versuchspersonen während der Belastung mit Ammoniumchlorid

der der α-Ketoglutaratkonzentration ca. 14 % auf 16,02 µM/l (s = ± 5,55 µM/l). In der Gruppe der Leberkranken ist der Abfall beider Substrate statistisch signifikant ($p < 0,005$). Der steile Anstieg der Ammoniakkonzentration geht also mit einem Abfall der Ketosäuren einher. Ein leichter Pyruvatanstieg wurde bei 2 Patienten mit einer Hepatitis und einem Patienten mit einem Zieve-Syndrom, ein sehr geringer Anstieg der α-Ketoglutaratkonzentration bei 3 Patienten mit einer Leberzirrhose gefunden, wofür wir jedoch keine Erklärung haben. Bei den gesunden Versuchspersonen fallen die Pyruvatwerte in 6 von 7 Fällen, die α-Ketoglutaratkonzentration in 5 von 6 Fällen ab. Dieser Abfall läßt sich wohl aufgrund der geringen Fallzahl in dieser Gruppe nicht statistisch sichern.

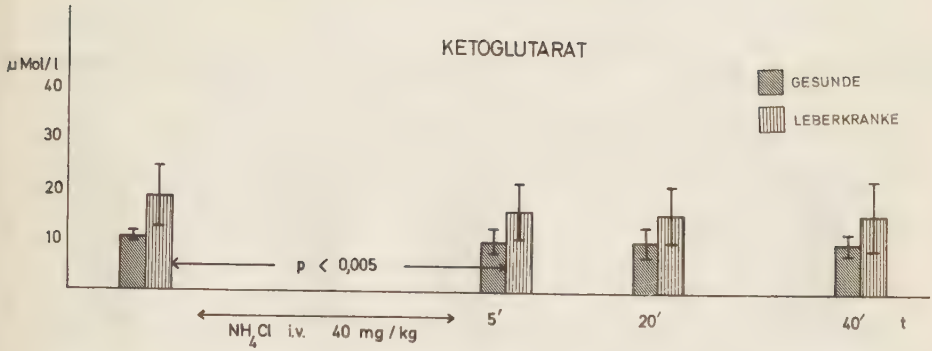

Abb. 5: Verhalten des α-Ketoglutarats bei Leberkranken und gesunden Versuchspersonen während der Belastung mit Ammoniumchlorid

Während der Belastungsversuche wurden bei 13 Leberkranken und 4 gesunden Versuchspersonen Harnstoffbestimmungen zu denselben Zeitpunkten durchgeführt, an denen die Blutentnahme zu den Substratbestimmungen erfolgte. Die Serumharnstoffkonzentration wurde im Autoanalyser nach SKEGGS (43) gemessen. Die Ausgangswerte der nüchternen Versuchspersonen betrug 31 mg % (s = ± 18,59 mg %) bei den Leberkranken und 29,75 mg % bei den gesunden Kontrollpersonen. Die Änderungen des Serumharnstoffs sind im ganzen Versuchsablauf außerordentlich gering und weichen in ihren Mittelwerten nur unwesentlich von den Ausgangswerten ab. 5 Minuten nach Infusionsende steigen die Harnstoffwerte bei den Leberkranken zwar auf $\bar{x}$ = 32,9 mg % an (bei den Gesunden nur auf $\bar{x}$ = 30,25 mg %), jedoch ist dieser Anstieg statistisch nicht zu sichern.

Bis zum Ende des Belastungszeitraums ändert sich die Harnstoffkonzentration nicht. 40 Minuten nach Infusionsende betragen die Mittelwerte bei den Versuchspersonen mit einem Leberschaden $\bar{x}$ = 32,58 mg %, bei den Gesunden 29,25 mg %. Dem steilen Anstieg der Ammoniakkonzentration geht also ein leichter, statistisch nicht signifikanter Anstieg der Serumharnstoffwerte parallel.

Abb. 6: Verhalten des Serumharnstoffs bei Leberkranken und gesunden Versuchspersonen während der Belastung mit Ammoniumchlorid

i.v. BELASTUNG mit NH_4CL bei LEBERGESUNDEN

	Ammoniak (γ%)				Pyruvat (µMol/l)				Ketoglutarat (µMol/l)			
	Ausgangswert	nach 5'	nach 20'	nach 40'	Ausgangswert	nach 5'	nach 20'	nach 40'	Ausgangswert	nach 5'	nach 20'	nach 40'
N	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6	6	5
$\bar{X}$	90,71	203,42	127,28	103,83	78,87	69,28	67,14	71,50	10,6	10,15	10,17	9,83
s	±42,79	109,4	46,18	33,02	16,22	15,70	9,06	12,34	1,03	2,53	2,95	2,28
p	→ 0,01 ↔ 0,05 ←											

Tab. 1: Ergebnisse der intravenösen Belastung mit Ammoniumchlorid bei Lebergesunden

i.v. BELASTUNG mit NH_4CL bei LEBERKRANKEN

	Ammoniak (γ%)				Pyruvat (µMol/l)				Ketoglutarat (µMol/l)			
	Ausgangswert	nach 5'	nach 20'	nach 40'	Ausgangswert	nach 5'	nach 20'	nach 40'	Ausgangswert	nach 5'	nach 20'	nach 40'
N	22	22	22	22	21	22	22	22	20	22	22	22
$\bar{X}$	146	322	229	183	97	79	82	76	18,6	16,02	15,72	15,48
s	± 90	210,2	160,7	119,3	32	26,6	27,7	23,8	6,14	5,55	5,73	6,96
p	→ 0,001 ↔ 0,001 ↔ 0,001 ←				→ 0,005 ←				→ 0,005 ←			

Tab. 2: Ergebnisse der intravenösen Belastung mit Ammoniumchlorid bei Leberkranken

2. Ergebnisse des Methodenvergleichs

Bei 21 lebergesunden Versuchspersonen wurde die Ammoniakkonzentration im Venenblut gleichzeitig mit den drei oben beschriebenen Methoden bestimmt und zwar mit der

1) einzymatischen Methode (21)
2) colorimetrischen Methode (28)
3) Mikrodiffusion mit "Nesslerisierung" (37)

Einzelheiten siehe im Abschnitt Methodik.

1) Enzymatische Methode:

Bei der enzymatischen Bestimmungsmethode beträgt der Mittelwert der Ammoniakkonzentration bei lebergesunden Versuchspersonen $\bar{x} = 111,5\ \gamma\%$, die Standardabweichung $s = \pm 58,44\ \gamma\%$. Die Eichkurve, die mit Ammoniumsulfatlösungen bekannter Konzentration gewonnen wurde, stellt eine Gerade dar.

Die Werte der Standardlösungen waren gut reproduzierbar. In Zusatzversuchen, in denen einem neutralisierten Trichloressigsäureextrakt des Blutes Ammoniumsulfatlösungen bekannter Konzentration zugesetzt wurden, ließen sich die zugegebenen Mengen innerhalb eines Fehlerbereichs von 10 % wiederfinden. Schlecht reproduzierbare Werte konnten auf unsaubere Glaswaren und Spatel zurückgeführt werden. Es ist erforderlich, besonders die Küvetten und die mit ihrem Inhalt in Berührung kommenden Geräte (Spatel, Pipetten) gründlich zu säubern. Küvetten, Spatel und Glaswaren wurden nach jedem Test in Chromschwefelsäure gereinigt und danach mehrmals mit dest. Wasser abgespült.

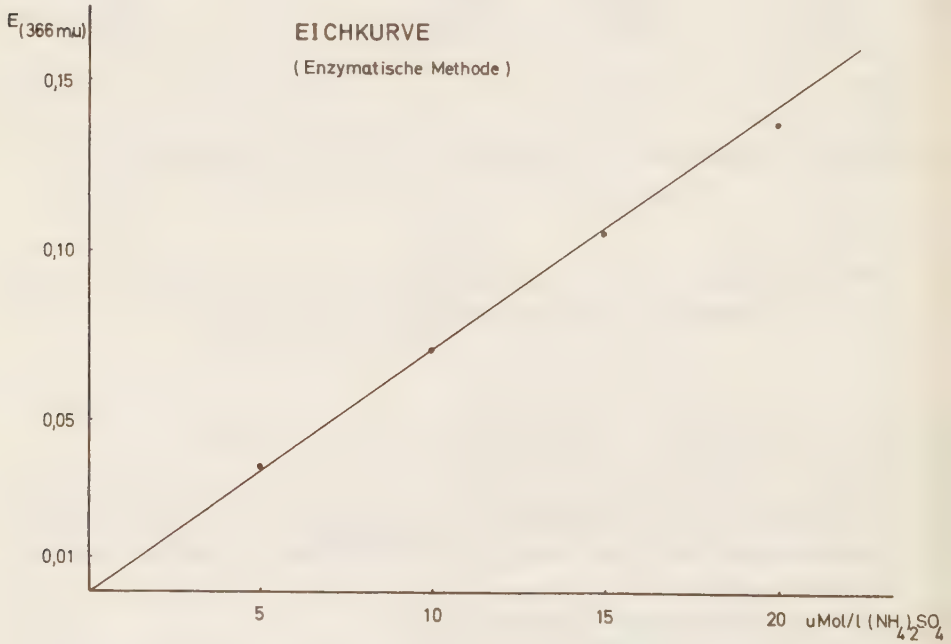

Abb. 7: Eichkurve mit Ammoniumsulfat-Standardlösungen

2) Colorimetrische Methode:

Der Mittelwert der Ammoniakkonzentration der lebergesunden Versuchspersonen liegt bei $\bar{x}$ = 85,71 γ% bei einer Standardabweichung von s = ± 23,37 γ%. Die Eichkurve (Abb. 8), die durch Farbansätze mit Ammoniumsulfat-Standardlösungen bekannter Konzentration gewonnen wurde, stellt eine Gerade dar. Die Streuung der Extinktion ist bei den einzelnen Ansätzen gering (unter 5 %).

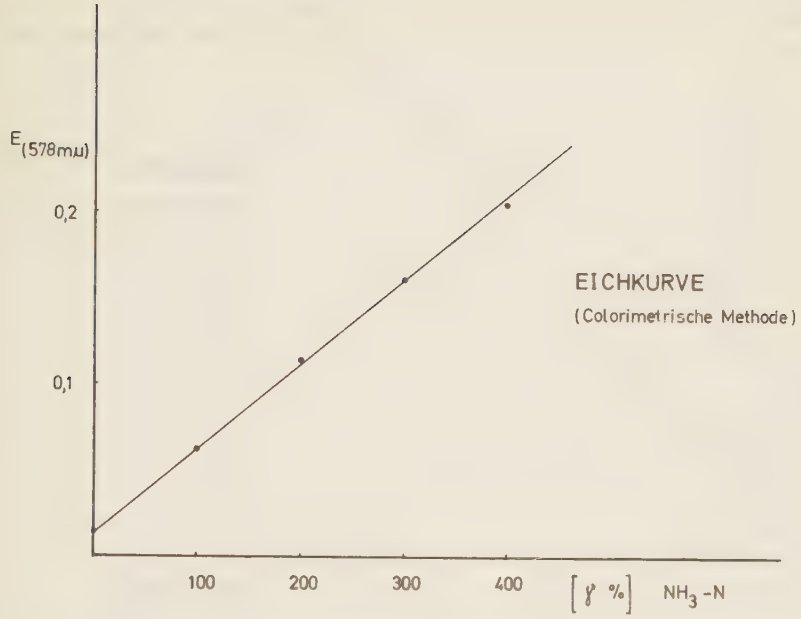

Abb. 8: Eichkurve: Farbansätze mit Ammoniumsulfat-Standardlösungen bekannter Konzentration

Die Reproduzierbarkeit der Werte bei Bestimmungen aus dem Blut war schlechter als bei bekannten Testlösungen. Bei einer lebergesunden Versuchsperson wurden in einer Spritze 15 ml venöses Blut entnommen und davon je 2 ml in 7 vorbereitete Ansätze gegeben. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Der Variationskoeffizient der 14 Extinktionsmessungen wurde mit VK = ±10,52% errechnet.

3) Mikrodiffusion und Reaktion mit Nesslers Reagens:

Bei dieser Bestimmungsmethode beträgt der Mittelwert der Ammoniakkonzentrationen bei Normalpersonen $\bar{x}$ = 101,9 γ%, bei einer Standardabweichung von s = ± 35,62 γ%. Die Kurven die mit Standardlösungen bekannter Ammoniumsulfatkonzentrationen gewonnen wurden, zeigen einen linearen Verlauf (Abb. 9).

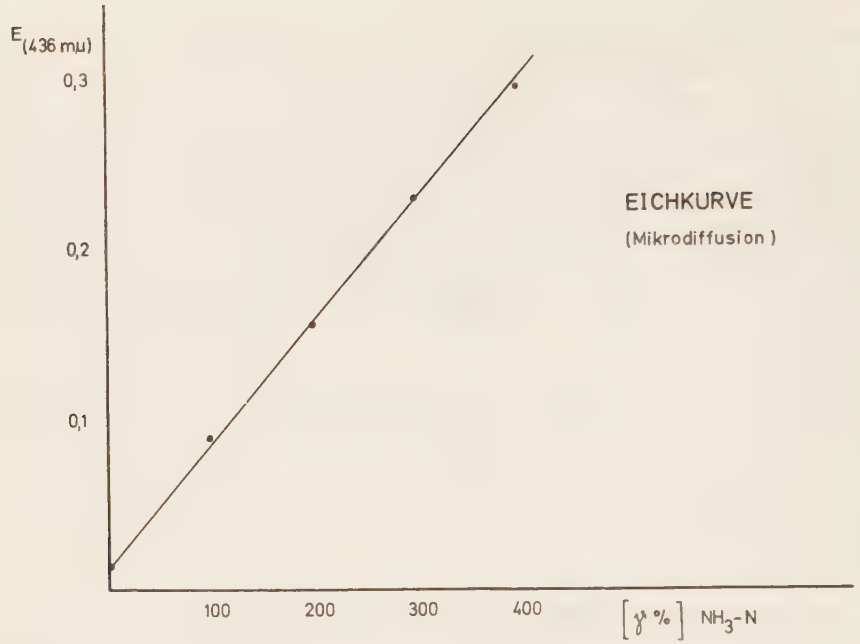

Abb. 9: Eichkurve mit Ammoniumsulfat-Standardlösungen bekannter Konzentration

Die Streuung der gemessenen Werte nimmt mit steigender Ammoniakkonzentration zu. Sowohl bei bekannten Standardlösungen als auch bei Blutproben waren die Werte gut reproduzierbar. Einer gesunden Versuchsperson wurden in einer Spritze 10 ml Venenblut entnommen und damit eine 10fach Bestimmung durchgeführt. Der Variationskoeffizient wurde mit VK = 4,25 % errechnet. Schlecht reproduzierbare Ergebnisse waren fast in allen Fällen auf ungenügend gereinigte Glaswaren zurückzuführen. Es ist empfehlenswert, die Gläschen und Stopfen getrennt von anderen Glaswaren zu waschen und nach der üblichen Reinigung noch zwei- bis dreimal mit dest. Wasser abzuspülen. Die in der Arbeitsanleitung angegebene Zeitdauer für die Mikrodiffusion und die Entwicklung des gelben Farbkomplexes nach Zusatz von Nesslers Reagens sollten eingehalten werden. RICHTERICH und COLOMBO (37) wiesen nach, daß nach etwa 25 Minuten die gesamte Ammoniakmenge auf den Glasstab diffundiert ist. Sie zeigten, daß die Intensität des gelben Farbkomplexes, der sich nach Abspülen der Rauhstäbe mit Nesslers Reagens bildet, über mehrere Stunden praktisch konstant bleibt. Die von ihnen beschriebene Trübungen, die nach unseren Beobachtungen jedoch auch so-

fort nach Zusatz des Reagens auftreten können, führten wir ebenfalls auf unsaubere Glaswaren zurück.

IV. DISKUSSION

1. Belastungsversuche

Wie seit den Untersuchungen an Gewebsschnitten von KREBS und HENSELEIT seit 1932 bekannt ist (23), wird das der Leber angebotene Ammoniak im Harnstoffzyklus (siehe Abb. 1) in Harnstoff umgewandelt. Der biologische Sinn dieser Reaktion liegt in der Entgiftung des NH_3. BOLLMAN (zit. nach KIRK, 20) konnte selbst nach einer 4/5 Resektion der Leber an Hunden auch unter Belastung keine signifikante Änderung der Harnstoffsynthese nachweisen. GLOGNER et al. (12) konnten zeigen, daß diese Funktion der Leber auch unter hypoxämischen Bedingungen erhalten bleibt. Die Kapazität der Harnstoffbildung in der Leber ist demzufolge groß. Bei zerstörter Zellstruktur (Homogenat) sinkt jedoch die Harnstoffbildung aus NH_3 auf nahezu Null ab (23). Die erhaltene Struktur der Leberzelle scheint eine Voraussetzung für die Harnstoffsynthese zu sein. WHITE et al. (52) konnten sowohl bei normalen Versuchspersonen, als auch bei Patienten mit einer Leberzirrhose nach oraler Belastung mit 3 g Ammoniumchlorid einen leichten Anstieg des Blutharnstoffspiegels beobachten. Nach intravenöser Belastung mit NH_4Cl (40 mg/kg Körpergewicht) konnten wir bei lebergesunden Kontrollpersonen und bei Patienten mit einem chronischen Leberschaden einen leichten Anstieg der Serumharnstoffkonzentrationen nachweisen. Eine statistische Sicherung der Änderung war nicht möglich, was wohl auf die geringe Menge des zugeführten Ammoniumchlorid und die schnelle Ausscheidung des Harnstoffs durch die Nieren (31) zurückzuführen ist.

In Übereinstimmung mit SELIGSON (40), SUMMERSKILL (48) und SMITH (44) wurden bei nüchternen Normalpersonen Ketoglutaratwerte von $10,6 \pm 1,03$ µM/l und Pyruvatwerte in Höhe von $\bar{x} = 78,85$ µM/l $\pm$ 16,2 µM/l gefunden. SMITH (44) beobachtete bei Patienten mit einer Leberzirrhose einen deutlichen Anstieg der α-Ketoglutarsäurekonzentrationen im Blut, während die Pyruvatwerte nur eine leichte, statistisch nicht signifikante Erhöhung zeigten. Ebenso wie SELIGSON (40) fanden wir die entsprechenden Werte bei Patienten mit einem Leberschaden deutlich erhöht. Unsere Mittelwerte betrugen für α-Ketoglutarat 18,03 $\pm$ 6,14 µMol/l und für Pyruvat 97,0 $\pm$ 32,09 µMol/l (siehe Tab. 1 und 2), und stimmen mit den von oben genannten Autoren angegebenen Werten gut überein.

Der signifikante Abfall der α-Ketoglutarat- und der Pyruvatkonzentrationen zum

Zeitpunkt des höchsten Ammoniakspiegels nach der intravenösen Belastung mit Ammoniumchlorid im venösen Blut steht im Gegensatz zu den Befunden von DAWSON (6), SUMMERSKILL (48) und STROHMEYER und MARTINI (47). Nach einer oralen Ammoniumchloridbelastung (3 g) bei 6 Patienten mit einem ausgedehnten portalen Kollateralkreislauf beobachtete DAWSON (6) in 4 Fällen einen deutlichen Anstieg der Pyruvatwerte im venösen Blut nach ca. einer Stunde, während 2 Patienten nur geringe Änderungen zeigten. Im Gegensatz dazu fanden SUMMERSKILL et al. (48) bei seinen gesunden Kontrollpersonen nach oraler bzw. intravenöser Belastung mit NH_4Cl einen späten Abfall des Pyruvats, bei Ketoglutarat keine regelmäßige Abweichung vom Ausgangswert. Seine Patienten mit einem Leberleiden zeigten jedoch einen leichten Anstieg des Pyruvats und des Ketoglutarats. STROHMEYER et al. (47) beobachteten nach oraler Gabe von 4 g NH_4Cl bei 16 Leberkranken neben einem steilen Anstieg der Ammoniakkonzentration ein unterschiedliches Verhalten von α-Ketoglutarat und Pyruvat. Die Ketosäurewerte streuten nach der Belastung stark. Es fielen während des Testes ausgesprochen niedrige Brenztraubensäurewerte auf. Gegen Ende des Belastungsversuchs (nach ungefähr 150 Minuten) stiegen die Konzentrationen der Ketosäuren im venösen Blut an. Die Änderungen waren statistisch nicht signifikant. Eine konstante Beziehung zwischen der Höhe des Ammoniakspiegels und den Ketosäurekonzentrationen im Blut konnte nicht festgestellt werden. Der Abfall der Ketosäurewerte, der mit dem starken Ansteigen der Ammoniakkonzentrationen einherging, war bei unseren Untersuchungen sowohl für α-Ketoglutarat, als auch für Pyruvat hoch signifikant ($p < 0,001$). Die Ketosäuren wurden in dieser Arbeit, wie auch von STROHMEYER mit einer enzymatischen Methode bestimmt, die gegenüber den Methoden anderer Untersucher den Vorzug einer hohen Spezifität, Genauigkeit und Einfachheit hat.

Es ist anzunehmen, daß es bei einer Hyperammoniämie, die z.B. als Folge peroraler Zufuhr von Protein (39), Blut (16) und anderer stickstoffhaltiger Substanzen (32) auftreten kann, zu einer vermehrten Bindung von Ammoniak an α-Ketoglutarsäure zu Glutaminsäure kommt. BESSMAN (1) glaubt, daß durch die Glutaminsynthese aus α-Ketoglutarat über Glutaminsäure (siehe Abb. 10) unter Verbrauch von NH_3 Ammoniak in den Muskeln und im Gehirn aufgenommen werden kann.

Der signifikante Abfall der α-Ketoglutarsäurekonzentration im venösen Blut, der mit dem Gipfel der Ammoniakkonzentration zusammenfälllt, spricht für diese Vorstellung. Es müßte sich eine vermehrte Bildung von Glutaminsäure oder Glutamin nachweisen lassen. GEROK (10) beschreibt eine statistisch allerdings nicht signifikante Zunahme der Glutaminsäurekonzentration im Serum von Patienten mit einer Leberzirrhose. Nach einer oralen Belastung mit Am-

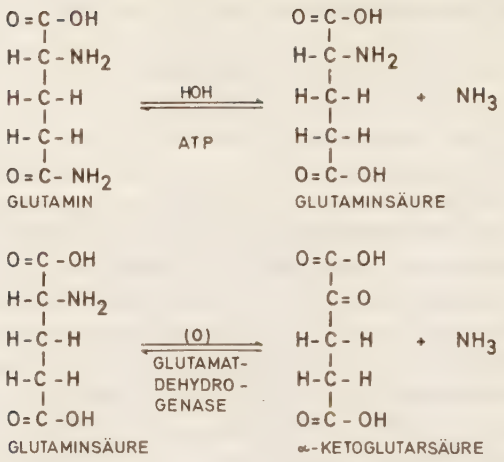

Abb. 10: Glutaminsynthese aus α-Ketoglutarsäure unter Verbrauch von NH_3

moniumchlorid fanden WHITE et al. (52) keine signifikante Änderung des Glutamingehaltes im peripheren Blut und im Lebervenenblut. Im Gegensatz dazu beobachteten KNAUFF et al. (19) unter oraler Eiweißbelastung einen erheblichen Glutaminanstieg. Der Glutaminsäurespiegel ist in diesen Versuchen nicht in dem Maße angestiegen, in dem die Substanz zugeführt wurde. KNAUFF schließt daraus, daß ein großer Teil der zugeführten Monoaminodicarbonsäuren primär durch Ammoniakaufnahme in die Säureamide übergehen. Dieser Weg stellt insofern eine zweckmäßige Reaktion dar, als es zu einer schnellen Entgiftung des freien Ammoniaks kommt, das in großer Menge bei der oxydativen Desaminierung der Aminosäuren entsteht. Aufgrund dieser Überlegungen führte WALSHE (51) bei einigen Patienten im Coma hepaticum eine Therapie mit Glutaminsäure durch.

In welchem Zusammenhang der bei den Untersuchungen beobachtete signifikante Pyruvatabfall mit dieser Reaktion steht, ist noch nicht geklärt. Eine biochemische Deutung dieser Veränderungen ist schwierig, da Pyruvat und α-Ketoglutarat an einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen beteiligt sind. Eine direkte Nachbildung des bei der einleitenden Reaktion verbrauchten α-Ketoglutarat aus Pyruvat über den Zitronensäurezyklus, was man auf Grund der Versuchsergebnisse annehmen könnte, erscheint jedoch nicht wahrscheinlich, da in dem Maße, in dem Ketoglutarat aus dem Zyklus abgezogen wird, auch eine verminderte Oxalacetat-

bildung erfolgt. Dieses Substrat ist für die kondensierende Reaktion notwendig. RECKNAGEL und POTTER (35) haben an Leberschnitten eine quantitative Umsetzung von Pyruvat zu Acetoacetat im Ammoniumchloridmilieu gesehen. Unter solchen extremen Bedingungen scheint der Mangel an Oxalacetat den Krebszyklus zum Erliegen zu bringen, Vorgänge, die mit einem Weiterleben des Organismus nicht vereinbar sind. Andererseits kann man den Pyruvatabfall bei gleichzeitiger Regeneration von α-Ketoglutarat über die Transaminierungsreaktion mit Hilfe der Pyruvattransaminase erklären. Dabei entsteht aus Glutamat und Pyruvat α-Ketoglutarat und Alanin. KNAUFF (19) hat nach einer oralen Proteinzufuhr bei Patienten mit einer Leberzirrhose im Blut erhöhte Alaninspiegel gefunden.

Trotz eines erheblichen Anstiegs der Ammoniakkonzentration traten während oder nach der Belastung bei keinem Patienten komaähnliche Zustände auf. In einigen Fällen klagten die Patienten über leichte Übelkeit. Nur 2 Patienten mit einer schweren Leberzirrhose mußten während der Infusion erbrechen. Einer dieser beiden Patienten hatte bereits einen hohen Ammoniakspiegel in nüchternem Zustand (182,5 γ%). Es ist anzunehmen, daß eine mögliche toxische Wirkung des Ammoniak eher von der Dauer der Einwirkung, als von der augenblicklichen Konzentration abhängt. Auch HAEFELY und Mitarbeiter (13) fanden, daß bei momentanen hohen Konzentrationen nur kurzfristige und geringgradige Einflüsse auf den Kohlenhydratstoffwechsel - auf diesen sind die Nervenzellen mangels Energiespeicher besonders angewiesen - nachweisbar sind, oder aber, daß ein anderer oder zusätzliche Mechanismen für das Zustandekommen der Bewußtseinsstörung im Leberversagen angenommen werden müssen. WALSHE (51) glaubt, daß die ungestörte Funktion des intrazellulären Ammoniakbindungsmechanismus wichtiger als der Plasmaammoniakspiegel ist. Ein hoher Blutammoniakspiegel kann in den Fällen gut toleriert werden, in denen der Ammoniakbindungsmechanismus erhalten bleibt. Bei Störung dieser Funktion kann es zur Entwicklung des Komas kommen, noch bevor die Blutammoniakkonzentration ansteigt. MÜTING et al. (29) fanden bei Patienten im Coma hepaticum auch normale Blutammoniakkonzentrationen. Bei einem komatösen Patienten mit einer Leberzirrhose konnten auch wir niedere Ammoniakwerte messen.

Eventuell kommt einer pH-Verschiebung bei der Auslösung eines Komas eine Bedeutung zu. Nur freies NH_3 kann die Membran der Gehirnzellen passieren, nicht aber ionisiertes. Nach MÜTING (29) macht bei einem pH von 7,4 der ionisierte Anteil (NH_4^+) 97,5 % des Gesamtammoniak aus. Mit zunehmender Alkalose nimmt der physikalisch gelöste Ammoniak zu, bei einer Azidose ab (siehe Abb. 11). KAUFMANN (18) und SCHWAB (38) beobachteten bei Patienten mit chronischer Hepatitis oder einer Leberzirrhose ohne Aszites eine re-

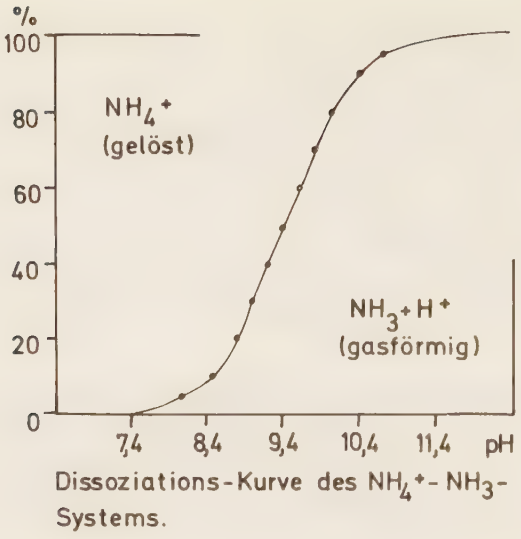

Abb. 11: Dissoziationskurve des NH_4^+ - NH_3 - Systems

spiratorische (18) bzw. eine metabolische Alkalose (38). Bei extrazellulärer pH-Erhöhung entsteht ein Druckgefälle für physikalisch gelöstes Ammoniak, das dadurch die Zellmembran leichter durchdringen kann. Eine verstärkte Toxizität des Ammoniaks kann durch eine Alkalose begünstigt werden.

Wie auch unsere Untersuchungen gezeigt haben, ist es nicht möglich, die Pathogenese des Coma hepaticum allein durch erhöhte Ammoniakspiegel im Blut zu erklären. Sicher können noch zahlreiche andere, bis jetzt unbekannte Faktoren bei der Entstehung des Komas mitwirken.

2. Diskussion zum Methodenvergleich

In unseren Untersuchungen wurden drei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Ammoniakkonzentration im Blut miteinander verglichen. Es sollten Genauigkeit, Reproduzierbarkeit, Übereinstimmung, Arbeitsaufwand und Brauchbarkeit für den Routinebetrieb untersucht werden.

Wie aus Tabelle 3 und Abbildung 12 zu ersehen ist, liegen die arithmetischen Mittel der Ammoniakkonzentrationen bei der enzymatischen Methode am höchsten ($\bar{x}$ = 111,5 γ%) und bei der colorimetrischen Bestimmungsmethode am niedrigsten ($\bar{x}$ = 85,71 γ%). Die Mikrodiffusionsmethode ergab einen Mittelwert von

ERGEBNISSE des METHODENVERGLEICHES
(Angaben in γ %)

	Enzymatisch	Mikrodiffusion	Colorimetrisch
N	21	21	21
$\bar{X}$	111,5	101,90	85,71
s	± 58,44	35,62	25,37
	⟶ p < 0,3 ⟵		
	⟶ p < 0,01 ⟵		
		⟶ p < 0,01 ⟵	

Tab. 3: Ergebnisse des Methodenvergleichs

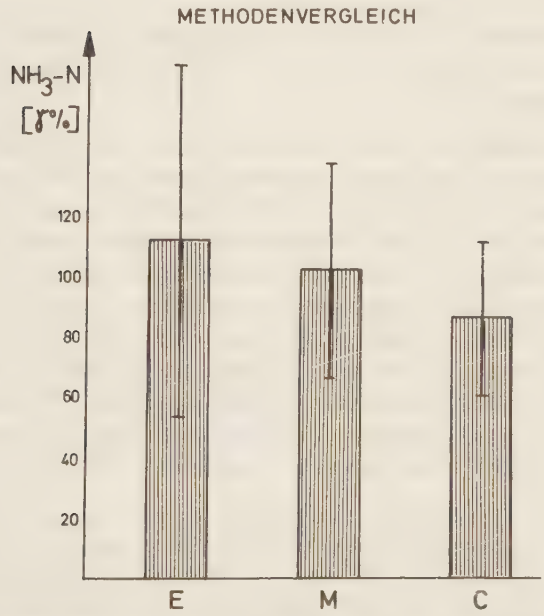

Abb. 12: Methodenvergleich: Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Ammoniakkonzentrationen (E: enzymatisch, C: colorimetrisch, M: Mikrodiffusion)

$\bar{x}$ = 101,9 γ% und eine Standardabweichung s = ± 35,62 γ%. Die Standardabweichungen der colorimetrischen Bestimmungsmethode (30 %) und der Mikrodiffusionsmethode (35 %) unterscheiden sich nur gering, während sie bei der enzymatischen Methode deutlich höher liegt (52 %). Die von MÜLLER-BEISSENHIRTZ (28) angegebenen Werte, die mit der von ihm modifizierten colorimetrischen Methode gemessen wurden, liegen etwas niederer, als die von uns ermittelten. Sie fanden bei 16 Normalpersonen einen Mittelwert von $\bar{x}$ = 47,1 γ %. der Streubereich lag zwischen 32 γ% und 85 γ%. Bei 32 Patienten ohne ein diagnostiziertes Leberleiden lagen ihre Werte allerdings höher ($\bar{x}$ = 66,5 γ%, Streuung von 35,5 γ% bis 110 γ%). Die Ergebnisse dieser Patientengruppe kann mit den von uns untersuchten lebergesunden Patienten am besten verglichen werden.

Bei Ammoniakbestimmungen im Vollblut mit der Mikrodiffusionsmethode fanden SELIGSON und HIRAHARA (41) Ammoniakkonzentrationen in Höhe von 137 γ% mit einer Standardabweichung von s = 26 γ%. Die Mittelwerte liegen etwas höher als bei unseren Messungen, die Standardabweichung dagegen ist geringer.

KIRSTEN und Mitarbeiter (21) konnten im Nüchternblut bei Normalpersonen kein Ammoniak nachweisen, eine Angabe, die im Widerspruch zu den Befunden anderer Autoren steht.

Wie in Abb. 13 deutlich wird, entsprechen sich die mit der SELIGSONschen Mikrodiffusionsmethode und die mit der colorimetrischen Methode bestimmten Werte am ehesten, wobei jedoch die mit der Mikrodiffusionsmethode gemessenen Werte deutlich höher liegen. Zwischen diesen beiden Bestimmungsmethoden ließ sich im t-Test nach STUDENT ein signifikanter Unterschied nachweisen, der, wie auch beim Vergleich der colorimetrischen mit der enzymatischen Methode, auf die verhältnismäßig großen Unterschiede der Mittelwerte zurückzuführen ist. Die Werte, die mit der enzymatischen Methode und die mit der Mikrodiffusion gemessen wurden, zeigen keinen signifikanten Unterschied im t-Test (siehe Tab. 3). Die Mittelwerte der Ammoniakkonzentrationen, die mit diesen beiden Methoden bestimmt wurden, stimmen ziemlich gut überein.

Die Streuung bei Mehrfachbestimmungen der Blutproben ist bei der Mikrodiffusionsmethode am geringsten (VK = 4,25 %), bei der colorimetrischen Methode liegen die Werte etwas höher (VK = 10,5 %). Der von MÜLLER-BEISSENHIRTZ (28) für die colorimetrische Methode angegebene Variationskoeffizient (VK = 13,34 %) entspricht unserem Ergebnis. Eine Zehnfachbestimmung ist bei der enzymatischen Methode nicht möglich, da die Extinktionen ziemlich rasch abnehmen. Werden zwei Proben rasch hintereinander dem Küvetteninhalt zuge-

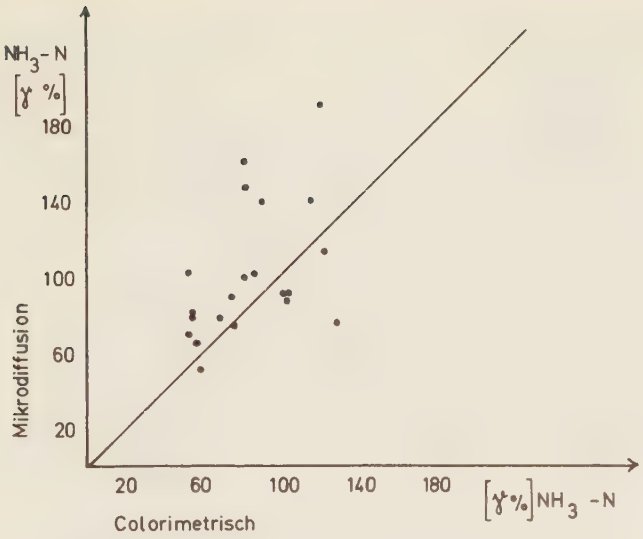

Abb. 13: Vergleich, der mit der Mikrodiffusionsmethode und der colorimetrischen Methode bestimmten Meßwerte

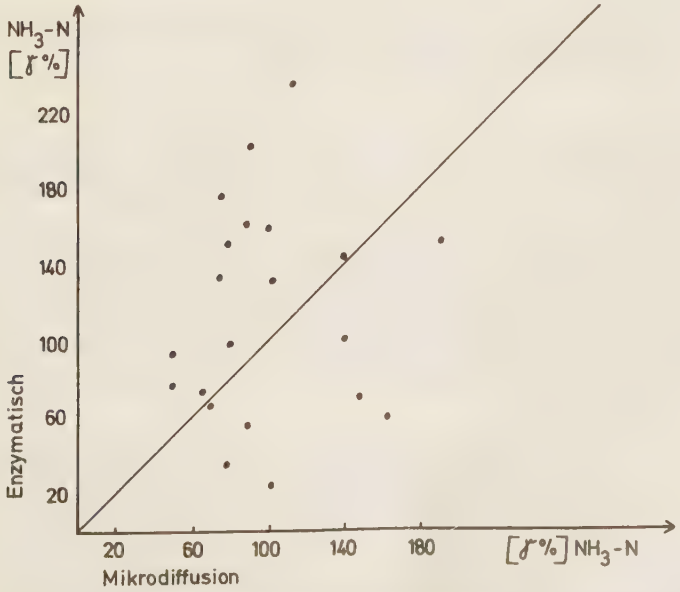

Abb. 14: Vergleich, der mit der Mikrodifussionsmethode und der enzymatischen Methode bestimmten Meßwerte

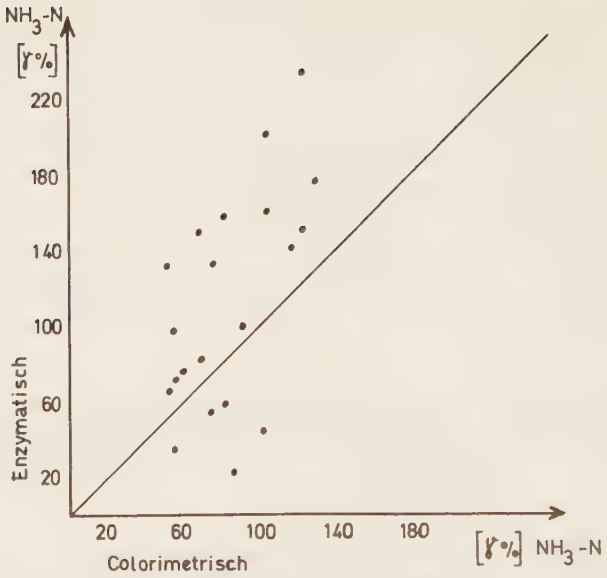

Abb. 15: Vergleich, der mit der colorimetrischen Methode und der enzymatischen Methode bestimmten Meßwerte

setzt, ist die Abnahme der Extinktion sehr gering (unter 2 - 3 %). In Zusatzversuchen konnte jedoch gezeigt werden, daß die gemessenen Ammoniakkonzentrationen annähernd den geforderten Werten entsprochen haben.

Der Arbeitsaufwand ist bei der enzymatischen Methode am größten. Es ist zweimaliges Wiegen der Röhrchen, Zentrifugieren und Neutralisieren notwendig, ehe die langsam ablaufende Reaktion gestartet werden kann. Durch die Verwendung eines Schreibers, der an das Photometer angeschlossen wurde, konnte dieser Zeitaufwand verringert werden, da gleichzeitig mehrere Reaktionsabläufe verfolgt werden konnten.

Technisch einfach und verhältnismäßig rasch kann Ammoniak mit der Mikrodiffusionsmethode mit "Nesslerisierung" bestimmt werden. Umständliches Pipettieren, das bei der colorimetrischen Methode ziemlich zeitraubend ist, wird bei der SELIGSONschen Methode vermieden. Allerdings ist ein sehr sorgfältiges und geübtes Arbeiten erforderlich. Die absolute Beherrschung der Technik ist bei allen Bestimmungsmethoden Voraussetzung für ordentliche Ergebnisse.

Die Chemikalienunkosten sind bei der enzymatischen Methode ziemlich hoch, für die auch ein häufiges Neuansetzen der Reaktionslösungen erforderlich ist. Gering sind die Kosten bei den beiden anderen Methoden, wenn man von den relativ hohen Anschaffungskosten für Glaswaren und das Zentrifugenrad für die Mikrodiffusionsbestimmung absieht. Ein Photometer wird bei allen drei Bestimmungsmethoden benötigt, jedoch wird es bei der enzymatischen Methode ziemlich lange besetzt, da die Reaktionskinetik verfolgt werden sollte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß keine der drei Methoden völlig überzeugt. Es hat sich jedoch gezeigt, daß bei Übung und Beherrschung der Technik alle drei Methoden ausreichend reproduzierbare Ergebnisse liefern. Die große Standardabweichung, der große Arbeitsaufwand und die hohen Chemikalienunkosten lassen die enzymatische Methode als weniger geeignet erscheinen. Nach persönlichen Erfahrungen wird für die Routineuntersuchungen der SELIGSONschen Methode der Vorzug gegeben.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß einer intravenösen Ammoniumchloridbelastung mit 40 mg NH_4Cl/kg Körpergewicht auf das Verhalten der Serumkonzentrationen von Ammoniak, Harnstoff, α-Ketoglutarat und Pyruvat bei sieben gesunden Versuchspersonen und 22 Leberkranken untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Die Ausgangswerte der Ammoniakkonzentrationen im Venenblut lagen bei den Leberkranken (146 ± 90 γ%) höher als bei den gesunden Versuchspersonen (90,7 ± 42,8 γ%). Die Erhöhung war statistisch nicht signifikant.

2. Unter der Belastung kam es in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg des Ammoniakspiegels im Blut, der 5 Minuten nach Infusionsende sein Maximum erreichte und nach weiteren 35 Minuten annähernd wieder die Ausgangswerte erreicht hatte. Der Anstieg war bei den Leberkranken steiler und höher als bei den Gesunden.

3. Die gleichzeitig bestimmten Konzentrationen des α-Ketoglutarats und des Pyruvats zeigten zum Zeitpunkt des höchsten Ammoniakspiegels einen signifikanten Abfall.

4. Die Serumharnstoffkonzentration zeigte während des Belastungszeitraums keine deutlichen Veränderungen.

5. Als Erklärung der Befunde wird der Zusammenhang des α-Ketoglutaratabfalls mit einer vermehrten Bildung von Glutaminsäure und Glutamin unter Ammoniakverbrauch und des Pyruvatabfalls mit einer Transaminierung zu Alanin diskutiert.
   Es werden verschiedene Möglichkeiten zur Erklärung der Pathogenese des Coma hepaticum aufgezeigt.

6. Es wurden drei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Ammoniakkonzentration miteinander verglichen. Dabei wurden Genauigkeit, Reproduzierbarkeit, Übereinstimmung, Arbeitsaufwand und Brauchbarkeit für den Routinebetrieb untersucht.

7. Alle drei Methoden - eine enzymatische-, eine colorimetrische- und eine Mikrodiffusionsmethode - ergaben ausreichend reproduzierbare Ergebnisse. Für Routineuntersuchungen wird die SELIGSONsche Mikrodiffusionsmethode empfohlen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. BESSMAN, S.P., A.N. BESSMAN:
The cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with an hypothesis for the mechanism of hepatic coma.
J. clin. Invest. 34 (1955) 622.

2. BERGMEYER, H.U., E. BERNT:
Alpha-Ketoglutarat
in: H.U. BERGMEYER
Methoden der enzymatischen Analyse
Weinheim 1962, Verl. Chemie.

3. BÜCHER, Th., R. CZOK, W. LAMPRECHT, E. LATZKO:
Pyruvat
in: H.U. BERGMEYER
Methoden der enzymatischen Analyse
Weinheim 1962, Verl. Chemie.

4. BOEHRINGER, C.F. & Soehne, Mannheim:
Sammlung von Laboratoriumsvorschriften ("Biochemia Boehringer").

5. CHOLOPOFF, A.D.:
Herkunft und Verteilung des Blutammoniaks nach Untersuchungen an angiostomierten Hunden.
Pflügers Arch. f. Physiologie 218 (1928) 670.

6. DAWSON, A.M., J. de GROOTF, W.S. ROSENTHAL, Sh. SHERLOCK:
Blood pyruvic - acid and alpha-ketoglutaric-acid levels in liver disease and hepatic coma.
The Lancet 272 (1957) 392.

7. FISCHLER, F.:
Über die Fleischintoxikation bei Tieren mit Eck'scher Fistel. Der Krankheitsbegriff der Alkalosis.
Dtsch. Arch. klin. Med. 104 (1911) 300.

8. FULD, H.:
Über die diagnostische Verwertbarkeit von Ammoniakbestimmungen im Blut.
Klin. Wschr. 12 (1933) 1364.

9. FÜRTH, O., A. FRIEDRICH, R. SCHOLL:
Über eine Farbenreaktion des Glykokolls und anderer Aminosäuren mit Natriumhypochlorit und Phenol.
Biochem. Z. 240 (1931) 50.

10. GEROK, W.:
Quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Serum bei Erkrankungen der Leber.
Dtsch. Med. Wschr. 88 (1963) 1188.

11. GILON, E., A. STEINBERG, G. TAUMAN, E. BODONYI:
Glutamine estimation in cerebrospinal fluid in cases of liver disease and hepatic coma.
J. Lab. clin. Med. 53 (1959) 714.

12. GLOGNER, P., H. NIETH, H. WAGNER, K. GLOEDE:
Perfusion der isolierten Rattenleber mit Rinderblut: Kohlenhydratstoffwechsel, Synthese von Harnstoff und Plasmaproteinen und Verhalten des Blutammoniakspiegels.
Klin. Wschr. 44 (1966) 1040.

13. HAEFELY, W., A. HÜRLIMANN, H. STAUB:
Zur Pathophysiologie des Ammoniakstoffwechsels. Bedeutung der bakteriellen Ureasewirkung im Intestinaltrakt für die Hyperammoniämie bei portocavalem Shunt.
Med. Klin. 57 (1962) 696.

14. HAHN, M., O. MASSEN, M. NENCKI, J. PAWLOW:
Die Eck'sche Fistel zwischen der unteren Hohlvene und der Pfortader und ihre Folgen für den Organismus.
Arch. Exp. Path. u. Pharm. 32 (1893) 161.

15. HENNRICH, G., H. BREUER:
Funktionsprüfung porto-cavaler Anastomosen mit Hilfe des Ammoniumchlorid-Belastungstestes.
Ärztl. Wschr. 13 (1958) 641.

16. YOUNG, P.C., C.R. BURNSIDE, H.C. KNOWLES:
The effect of intragastric administration of whole blood on the blood ammonia, blood urea, nitrogen and non-protein nitrogen in patients with liver disease.
J. clin. Invest. 35 (1956) 747.

17. KARLSON, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Georg Thieme Verl. Stuttgart 1964, 4. Auflage.

18. KAUFMANN, W., J. GREVEN, F. DÜRR:
Säure-Basen-Gleichgewicht bei Lebererkrankungen.
Dtsch. Med. Wschr. 46 (1966) 2067.

19. KNAUFF, H.G., D. SEYBOLD, A. KANTERS:
Freie Plasmaaminosäuren und Blutammoniak nach oraler Proteinzufuhr. Untersuchungen bei Gesunden und bei Patienten mit Leberzirrhose.
Klin. Wschr. 43 (1965) 382.

20. KIRK, E.:
Amino acid and ammonia metabolism in liver disease.
Acta Med. Scand. 77-78 (1936) 1.

21. KIRSTEN, E., C. GEREZ, R. KIRSTEN:
Eine enzymatische Mikrobestimmung des Ammoniaks geeignet für Extrakte tierischer Gewebe und Flüssigkeiten. Bestimmung des NH_4^+ - Gehaltes im Blut.
Biochem. Z. 337 (1963) 312.

22. KONITZER, K., S. VOIGT:
Direktbestimmung von Ammonium in Blut- und Gewebsextrakten mit der Phenol-Hypochloritreaktion.
Clin. chim. Acta 8 (1953) 5.

23. KREBS, H.A., K. HENSELEIT:
Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper.
Hoppe-Seylers Z. Phyiol. Chem. 210 (1932) 33.

24. MARTINI, G.A.:
Die Bedeutung des Blutammoniaks für die Entstehung des Leberkomas.
Dtsch.Med. Wschr. 86 (1961) 1351.

25. MARTINI, G.A., E.A. PHEAR, B. RUEBENER, S. SHERLOCK:
The bacterial content of the small intestine in normal and cirrhotic subjects: relation of the methionine toxicity.
Clin. Sci. 16 (1957) 35.

26. MARTINI, G.A., G. STROHMEYER, W. DÖLLE:
Die Behandlung des Leberkomas mit antibiotischen Mitteln (Chlortetracyclin, Neomycin).
Medizinische 52 (1959) 2549.

27. MONGUIO, J., Fr. KRAUSE:
Über die Bedeutung des NH_3-Gehaltes des Blutes für die Beurteilung der Leberfunktion.
Klin. Wschr. 13 (1934) 1142.

28. MÜLLER-BEISSENHIRTZ, W., H. KELLER:
Zur Bestimmung des Blutammoniaks.
Klin. Wschr. 43 (1965) 43.

29. MÜTING, D., H. REIKOWSKI, W. ESCHRICH, H. BUHL, G.A. JUTZLER:
Zur Pathogenese und Klinik des Coma hepaticum.
Dtsch. Med. Wschr. 91 (1966) 1449.

30. NENCKI, M., J.P. PAWLOW, J. ZALESKI:
Über den Ammoniakgehalt des Blutes und der Organe und die Harnstoffbildung bei den Säugethieren.
Arch. Exp. Path. Pharm. 37 (1896) 26.

31. OWEN, E.E., R.R. ROBINSON:
Renal ammonia release during ammonium chloride acidosis.
Amer. J. Physiol. 208 (1965) 58.

32. PHILLIPS, G.B., R. SCHWARTZ, G.J. GABUZDA, C.S. DAVIDSON:
The syndrome of impending hepatic coma in patients with cirrhose of the liver given certain nitrogenous substances.
New Engl. J. Med. 247 (1952) 239.

33. PITTS, R.F.:
Present status of our knowledge concerning ammonium excretion: biochemical mechanisms and physiologic regulation.
In: Ann. Conf. kidney, 15th, edited by Metcoff.
Boston: Little, Brown, 1964.

34. POPPER, H., F. SCHAFFNER:
Die Leber (Struktur und Funktion).
G. Thieme Verlag, Stuttgart 1961.

35. RECKNAGEL, R.O., R. v. POTTER:
Mechanism of the ketogenic effect of ammonia chloride.
J. biol. Chem. 191 (1961) 263.

36. RICHTERICH, R.:
Klinische Chemie (Theorie und Praxis).
Akad. Verlagsgesellschaft Frankfurt a.M. 1965.

37. RICHTERICH, R., J.P. COLOMBO:
Ultramikromethoden im klinischen Laboratorium, 3. Prinzip der Ammoniakbestimmung durch Mikrodiffusion und Nesslerisierung.
Das ärztl. Laboratorium (Zs.) 8 (1962) 129.
Laborarzt - Verlag Dr. Ruppert, Würzburg.

38. SCHWAB, M. H. DAMASCHKE:
Atmung, Säuren-Basen-Gleichgewicht und Ammoniak/Ammonium im Blut und Liquor cerebrospinalis bei Leberzirrhose.
Klin. Wschr. 40 (1962) 184.

39. SCHWARTZ, R., G.B. PHILLIPS, J.E. SEEGMILLER, G.J. GABUZDA, C.S. DAVIDSON:
Dietary protein in the genesis of hepatic coma.
New Engl. J. Med. 251 (1954) 685.

40. SELIGSON, D., G.J. McCORMICK:
Blood ketoglutarate and pyruvate in liver disease.
J. clin. Invest. 31 (1952) 661.

41. SELIGSON, D., K. HIRAHARA:
The measurement of ammonia in whole blood, erythrocytes and plasma.
J. Lab. clin. Med. 49 (1957) 962.

42. SHERLOCK, S.:
Krankheiten der Leber und der Gallenwege.
J.F. Lehmann-Verlag, München, 3. Aufl. 1965.

43. SKEGGS, L.T.:
An automatic method for colorimetric analysis.
Amer. J. clin. Path. 28 (1957) 311.

44. SMITH, L.H., R.H. ETTINGER, D. SELIGSON:
A comparison of the metabolism of fructose and glucose in hepatic disease and diabetes mellitus.
J. clin. Invest. 32 (1953) 273.

45. STAHL, J.:
Studies of the blood ammonia in liver disease.
Ann. Int. Med. 58 (1963) 1.

46. STROHMEYER, G., G.A. MARTINI, V. KLINGMÜLLER:
Veränderungen von Alpha-Ketoglutarsäure, Brenztraubensäure und Diphosphopyridinnucleotid bei chronisch Leberkranken.
Klin. Wschr. 35 (1957) 385.

47. STROHMEYER, G., K. SCHNEIDER, G.A. MARTINI:
Das Verhältnis von Blutammoniak zu Ketosäuren bei chronisch Leberkranken.
Klin. Wschr. 41 (1963) 413.

48. SUMMERSKILL, W.H., S.J. WOLFE, C.S. DAVIDSON:
The metabolism of ammonia and alpha-keto-acids in liver diesease and hepatic coma.
J. clin. Invest. 36 (1957) 361.

49. TANNHAUSER, S.J.:
Die chemischen Leistungen der normalen Leber für die Vorgänge des intermediären Stoffwechsels.
Klin. Wschr. 12 (1933) 49.

50. VANSELOW, A.P.:
Preparation of Nesslers reagent.
Indust. Engineer Chem. Anal. Ed. 12 (1940) 516.

51. WALSHE, J.M.:
Glutamic acid in hepatic coma.
Lancet 268 (1955) 1237.

52. WHITE, L.P., E.A. PHEAR, W.H.J. SUMMERSKILL, S. SHERLOCK:
Ammonium tolerance in liver disease: observations based on catheterization of the hepatic veins.
J. clin. Invest. 34 (1955) 158.

53. ZÖLLNER, N., P. BIRK:
Die Bestimmung des Blutammoniaks und ihre Ergebnisse bei Leberkrankheiten.
Klin. Wschr. 36 (1958) 570.

Lebenslauf

Am 5. Juli 1942 wurde ich, Hans Wilhelm Kunz, als Sohn des Oberforstdirektors Gerhard Kunz und seiner Ehefrau Luise geb. Koepf in Stuttgart geboren.

Von 1948 bis 1952 besuchte ich in Königsbronn (Kreis Heidenheim) die Grundschule, ab 1952 den sprachlich mathematischen Zweig des Schubart Gymnasium Aalen. 1961 bestand ich die Reifeprüfung.

1961 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Medizinstudium und bestand dort 1962 die naturwissenschaftliche und 1963 die ärztliche Vorüfung. Anschließend studierte ich je ein Semester an der Universität Freiburg und der Universität Wien. Im Herbst 1964 immatrikulierte ich mich wieder an der Universität Tübingen und konnte hier im Januar 1967 mein Studium mit dem Medizinischen Staatsexamen abschließen.